

ПРОЦЕССЫ АГРЕГАЦИИ КРАСИТЕЛЕЙ В РАСТВОРАХ ДЕТЕРГЕНТА

Э. ЛЕХОЦКИ и Я. ХЕВЕШИ

Кафедра биофизики университета им. Аттилы Йожефа, г. Сегед

(Поступило в Редакцию 1. декабря 1971. г.)

В работе исследованы изменения абсорбционных свойств растворов, содержащих $5 \cdot 10^{-6}$ моль/л родамина 6Ж и $2 \cdot 10^{-6}$ — $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л тионина в зависимости от концентрации детергента, натрий-лаурилсульфата. На основе данных спектров поглощения, средних мицеллярных весов и диализа систем краситель-детергент установлено, что молекулы красителей концентрируются в мицеллах и создается высокая локальная концентрация красителей, на 2—3 порядка больше, чем рассчитанная на весь объем раствора. Это явление убедительно свидетельствует о применимости мицеллярных растворов, как модельной системы, для исследования фотофизических процессов фотосинтеза.

В биологических исследованиях и в частности при изучении различных вопросов фотосинтеза давно используют растворы обработанные детергентами, например для изучения спектрофотометрических и фотохимических свойств нерастворимых в воде хлорофиллов и их производных [1, 2], для выделения и изолирования фрагментов хлоропластов и определения их спектрофотометрических свойств и фотохимической активности [3, 4], а в последнее время растворы детергентов применяются при изучении миграции возбуждающей энергии, как модельная система фотосинтетического аппарата [5—7]. В настоящей работе нам хотелось бы указать на то, что какую важную роль играют в подобных исследованиях мицеллы, образующиеся в растворах детергента.

В растворах детергенты обычно играют двойную роль: с одной стороны, вследствие поверхностно-активных и амфотерных свойств они способствуют растворению трудно растворимых веществ [8], а с другой стороны при определенных концентрациях детергента (при так называемой критической концентрации мицеллообразования, ККМ) в растворах происходит образование мицелл, и при подходящих условиях растворенные вещества могут концентрироваться в мицеллах.

Систематическое исследование спектров поглощения и люминесценции систем краситель-детергент [9—11] привело нас к предположению, что абсорбционные и люминесцентные свойства, а так же передача возбуждающей энергии зависит от концентрации детергента и красителя. Эту зависимость можно объяснить если предположить, что распределение красителя в растворе не равномерно, и вместо концентрации относящейся к равномерному распре-

лению в некоторых местах имеется значительно больше, „локальная” концентрация красителя.

Это последнее свойство растворов детергента, содержащих мицеллы часто не учитывается при оценке спектральных и фотохимических свойств пигментов.

Цель настоящей работы установить, в какой мере молекулы красителей встраются в мицеллы и концентрируются в растворах детергента, содержащих мицеллы и выяснить возможную роль растворов детергента в спектральных изменениях красителей.

Методы измерения и обсуждение результатов

Исследованы растворы детергента натрий-лаурилсульфата (SLS), родамина 6Ж (Rh), тионина (Th), а также смешанные растворы этих красителей. Способ приготовления растворов и методы измерения электропроводимости и спектров поглощения описаны в работах [9—11]. Средний мицеллярный вес был определен с помощью аналитической ультрацентрифуги, типа G-120 (производство MOM) методом, описанным в работе [12]. Мера встроения красителей в мицеллы определялось методом диализа, основанным на разницу скоростей диффузии между мицеллами и молекулами красителя, находящимися в свободном состоянии.

Смешанные растворы Th и Rh были исследованы, чтобы получить информацию о миграции энергии между этими красителями однако с точки зрения настоящей работы внимание обращено в первую очередь на Th потому, что концентрация Rh в выбранных смешанных растворах была небольшая ($5 \cdot 10^{-6}$ моль/л) и постоянная. Если в растворах краситель-детергента содержание Rh или Th $5 \cdot 10^{-6}$ моль/л тогда спектры поглощения красителей и их смешанных растворов в зависимости от концентрации детергента показывают следующие закономерности [10]. Максимум спектра поглощения мономерной формы Rh расположен при 528 нм. В случае маленьких концентрациях ($2.0\text{—}2.5 \cdot 10^{-3}$ моль/л) детергента при 496 нм в виде плеча появится полоса, характерная для димера Rh. В спектрах поглощений растворов Th в зависимости от концентрации детергента можно наблюдать полосы с различными интенсивностями, характерные для мономера (602 нм), димера (565 нм) и комплекса краситель-детергента (465 нм). Для более детального познания природы возникновения этих полос в настоящей работе приводятся следующие экспериментальные данные.

При более высоких концентрациях Th и изменении концентрации детергента значительные изменения можно наблюдать в спектрах поглощения. При меньших концентрациях детергента в спектрах растворов, содержащих $2 \cdot 10^{-5}$ моль/л Th кроме полос мономера, димера и комплекса краситель-детергента наблюдается новая полоса при 640 нм (рис. 1). Интенсивность её максимальна при $2 \cdot 10^{-3}$ моль/л детергента, и с увеличением концентрации детергента уменьшается, а выше ККМ полностью исчезает. Так как эта полоса появится в спектрах поглощения при высоких концентрациях Th и определенной концентрации детергента и интенсивность её уменьшается с повышением температуры, поэтому можно сказать, что появление этой полосы связано с образованием агрегатов тионина.

В спектрах поглощения смешанных растворов без детергента с постоянной концентрацией ($5 \cdot 10^{-6}$ моль/л) Rh и при высоких концентрациях Th, максимум поглощения Rh, расположенный при 528 нм наблюдается только в виде плеча из-за увеличения поглощения Th (рис. 2). Видно также, что в исследованной области концентрации красителя образование или наличие значительного количества агрегатов не наблюдается.

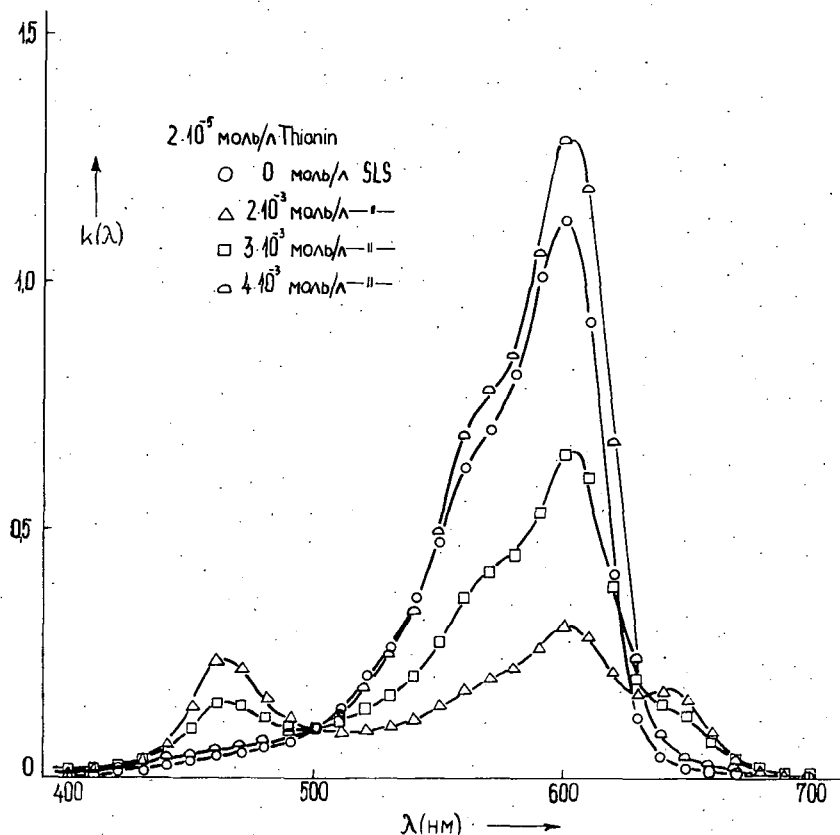


Рис. 1. Спектры поглощения растворов $2 \cdot 10^{-5}$ моль/л Th при различных концентрациях детергента

В спектрах поглощения смешанных растворов, содержащих $5 \cdot 10^{-6}$ моль/л Rh и $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л Th видно, что при маленьких концентрациях детергента значительно увеличивается интенсивность полосы комплекса краситель-детергента а полоса при 640 нм, характерная для агрегированных форм Th, становится более определенным, и в то же время полоса мономерной формы (при 602 нм) резко уменьшается (рис. 3).

Этот факт, а так же то, что увеличение интенсивности полосы при 640 нм с повышением концентрации Th в области ККМ происходит с одновременным уменьшением интенсивности полосы, соответствующей комплексу краситель-

детергента и мономерной формы Th, указывает на то, что за появление полосы при 640 нм ответственны агрегаты красителя (рис. 4). Можно установить так же, что при более высоких концентрациях Th, из-за присутствия большего количества молекул красителя, полное растворение комплексов красителя и равномерное распределение их происходит только в растворах, содержащих значительное количество мицелл (напр. при $6 \cdot 10^{-3}$ моль/л SLS). К такому заключению можно прийти при исследовании люминесценции систем краситель-детергента.

В области $2 \cdot 10^{-6}$ — $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л концентрации Th в растворах, не содержащих детергента, практически не происходит образование агрегатов красителей, поэтому может казаться странным такая значительная агрегация в растворах с детергентами. Однако, принимая во внимание структуры мицеллы

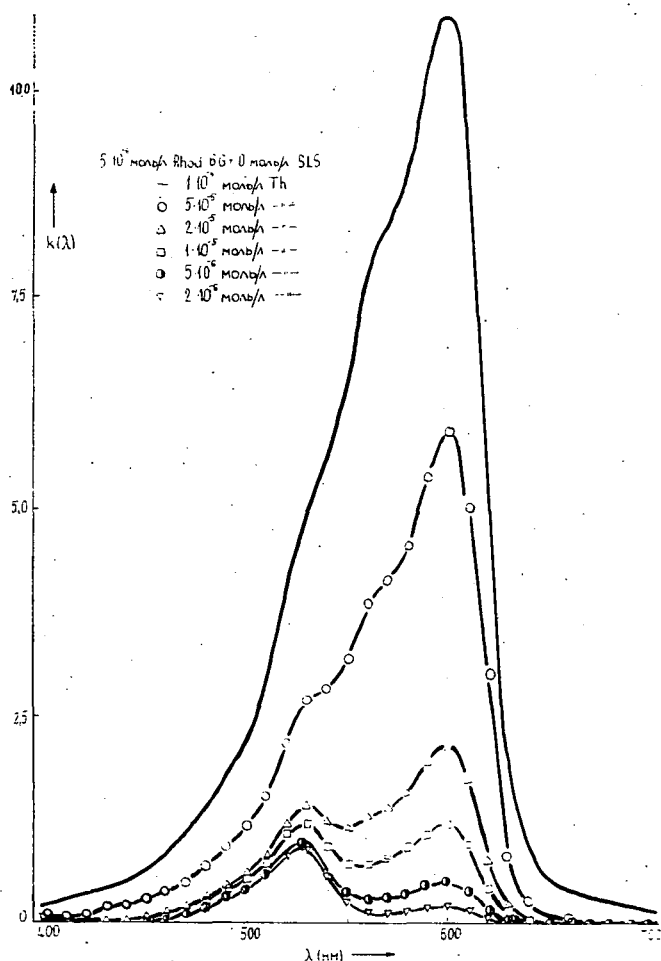


Рис. 2. Спектры поглощения смешанных растворов Rh и Th в воде

[14, 15], можно объяснить это явление. Как известно красители находятся в водной фазе мицеллы, полезный объём — то есть объём водной фазы мицеллы маленький, следовательно локальная концентрация красителя в мицеллах может превышать на несколько порядок концентрацию, рассчитанную на весь объём раствора.

Для доказательства встроения красителей в мицеллы и определения меры встроения мы приводим следующие экспериментальные данные:

а) Максимумы спектров поглощения и люминесценций растворов краситель-детергента смещены на 4—10 нм в сторону длинных волн по сравнению с водным раствором, что указывает на возникновение значительного взаимодействия между красителем и детергентом.

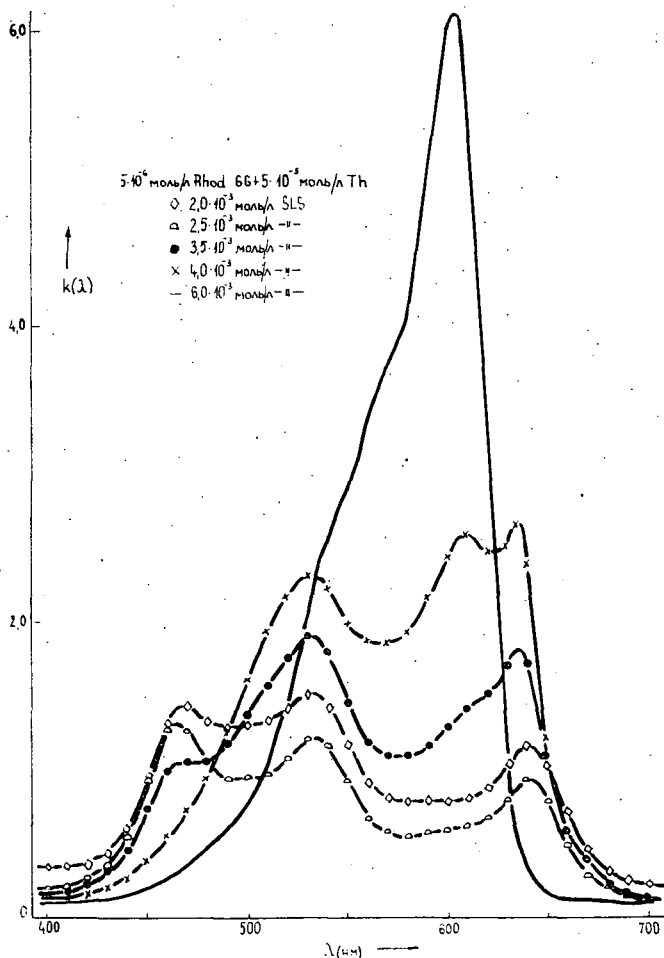


Рис. 3. Спектры поглощения смешанных растворов, содержащих $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л Rh и $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л Th при различных концентрациях детергента

б) После 24 часового диализа растворов, содержащих $4 \cdot 10^{-3}$ моль/л детергента и $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л Rh или Th, мы определяли концентрацию красителей внутри мембрана и во внешнем растворе. Результаты показывают, что молекулы красителя действительно находятся в мицеллах, и в свободном состоянии находится не больше, чем 5—10% красителя (таблица 1.).

в) Если молекулы красителя находятся в мицеллах, то мицеллярный вес увеличивается с количеством молекул красителей, встроенных в мицеллы. Исходя из этого предположения определяли средние мицеллярные веса растворов, содержащих только 4 или $8 \cdot 10^{-3}$ моль/л детергента и растворов содержащих кроме детергента $1 \cdot 10^{-4}$ или $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л Rh. Изменение относительных мицеллярных весов (таблица II.) тоже доказывает, что молекулы красителя действительно находятся в мицеллах.

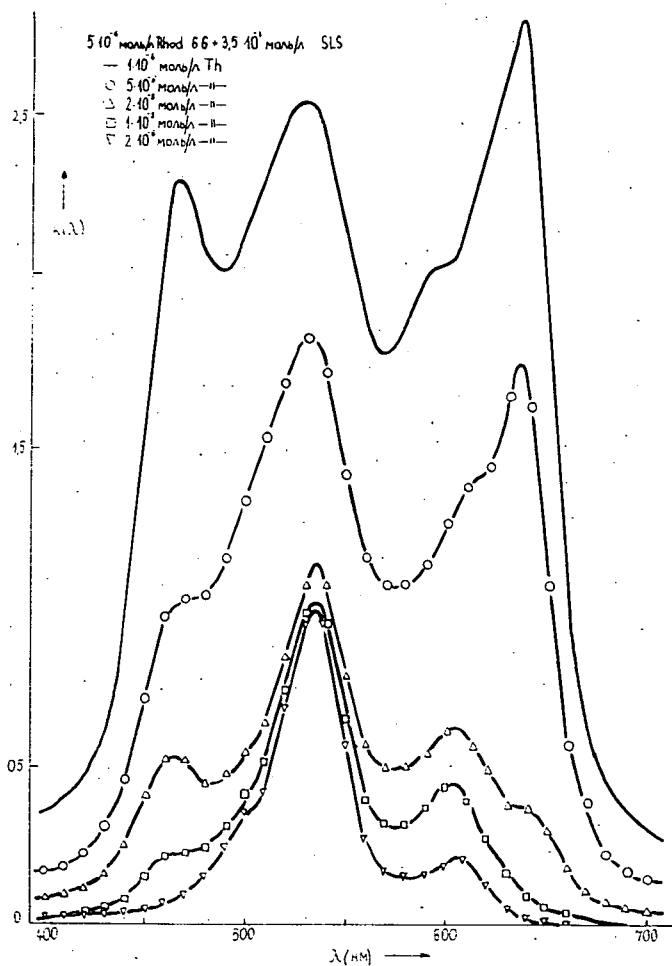


Рис. 4. Спектры поглощения смешанных растворов Rh и Th в присутствии $3,5 \cdot 10^{-3}$ моль/л детергента

Таблица I
Распределение красителей после диализа

Раствор	Исходное количество красителя ($\times 10^4$ г.)	Количество красителя внутри мембрана		Количество красителя во внешнем растворе	
		($\times 10^4$ г.)	%	($\times 10^4$ г.)	%
$1 \cdot 10^{-4}$ моль/л Rh	9.02	5.27	58.4	3.74	41.4
$1 \cdot 10^{-4}$ моль/л Rh $4 \cdot 10^{-2}$ моль/л SLS	22.55	23.35	103.5	—	—
$1 \cdot 10^{-4}$ моль/л Th	5.28	3.25	61.6	2.04	38.6
$1 \cdot 10^{-4}$ моль/л Th $4 \cdot 10^{-3}$ моль/л SLS	13.18	13.58	103.0	0.44	3.4

После того, как строение и концентрирование молекул красителей в мицеллах можно принять экспериментально доказанным, открывается возможность более детального изучения выше описанных изменений спектров поглощения.

По соображениям и расчётам Мукарджи и соотрудников [16], на основе измерения электропроводимости определяли число индуцированных красителем мицелл, предполагая, что в среднем из 100 ионов LS^- образуется одна мицелла (таблица III). В этой таблице C_{SLS} обозначает концентрацию детергента, $M(LS^-)$ — доля

Таблица II

Изменение мицеллярных весов растворов при различных концентрациях детергента и родамина 6Ж

C_{Rh} (моль/л) \ C_{SLS} (моль/л)	0	$1 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-4}$
$4 \cdot 10^{-3}$	100	136	235
$8 \cdot 10^{-3}$	100	141	220

мицеллизированных ионов LS^- (в %), $M(c)$ — концентрацию мицеллизированных ионов LS^- , $M(n)$ — число мицеллизированных ионов LS^- , и N — число индуцированных мицелл, образованных в растворе. Полученные данные показывают, что количество мицелл увеличивается с повышением концентрации

Таблица III

Определение количества мицеллы при различных концентрациях детергента в присутствии красителей

$C_{SLS} \cdot 10^{-3}$ (моль/л)	$M(LS^-)$ %	$M(c)$ (10^{-5} моль/л)	$M(n)$ ($\times 10^{19}$)	N ($\times 10^{17}$)
3.0	1.3	3.9	2.35	2.35
3.5	2.5	8.8	5.27	5.27
4.0	3.0	12.0	7.23	7.23
6.0	3.4	20.4	12.29	12.29

детергента, а так же, что оно практически не зависит от концентрации красителя.

Зная число мицелл и концентрацию красителя, находящегося в мицеллах и предполагая равномерное распределение красителя, можно рассчитать среднее количество молекул красителя на одну мицеллу и расстояние R между молекулами красителя в мицелле [16, 6]. Результаты расчётов выше ККМ детергента приведены в таблице IV., где $F(n)$ означает число молекул красителя в мицеллах при предположении, на основе данных диализа 90%-ое встроение красителя, $M(Fn)$ — число молекул красителя на мицеллу, и R — среднее расстояние между молекулами красителя. Следует отметить, что полученное число молекул красителя на мицеллу в области ККМ находится в хорошем согласии с данными других авторов [16, 6].

Таблица IV

Количество красителей в одной мицелле и расстояние между молекулами красителей

С _{Тн} (моль/л)	C _{SL} · 10 ⁻³ F(n) · 10 ¹⁷	3.0		3.5		4.0		6.0	
		M(Fn)	R(Å)	M(Fn)	R(Å)	M(Fn)	R(Å)	M(Fn)	R(Å)
0	27.1	12	43	5	100	4	125	2—3	250
2 · 10 ⁻⁶	38.0	16	31	7	71	5	100	3	170
5 · 10 ⁻⁶	54.2	23	22	11	45	8	62	4—5	110
1 · 10 ⁻⁵	81.3	35	14	16	31	12	42	7	71
2 · 10 ⁻⁵	135.5	58	9	26	19	19	26	11	45
5 · 10 ⁻⁵	298.1	127	4	57	9	41	12	24	21
1 · 10 ⁻⁴	569.2	242	2	108	5	79	6—7	46	11

Сравнивая изменение спектров поглощения с данными таблицы IV. абсорбционные изменения T_h становятся более ясными. Взаимодействия между молекулами красителя и между молекулами красителя и детергента, приводящие к увеличению интенсивности полос комплексов и агрегатов, или к уменьшению полосы мономерной формы, зависят от локальной концентрации красителя, которая в этом случае пропорциональна расстоянию между молекулами красителя. Если в растворе имеется довольно большое количество мицелл (напр. в растворе, содержащем $6 \cdot 10^{-3}$ моль/л детергента), тогда расстояние между молекулами красителя больше, взаимодействие между ними незначительное и следовательно спектры поглощения являются бесструктурными. При высоких концентрациях красителя молекулы находятся близко друг к другу, и за счёт уменьшения концентрации мономерной формы красителя образуются димеры, комплексы краситель-детергента и в значительном количестве агрегаты высшего порядка. Значит, на основе экспериментальных данных можно сказать, что в растворах детергента, содержащих мицеллы создаётся локальная концентрация красителя, которая по нашим приближенным расчётам может быть на 2—3 порядка больше, чем расчётная концентрация

красителя. Поэтому понятно, что спектры поглощения растворов краситель-детергента показывают такие значительные изменения по сравнению со спектрами водных растворов без детергента.

Нам ясно, что эти данные необходимо учитывать при изучении и оценке передачи возбуждающей энергии. Однако, вероятно, что явление концентрирования красителей, найденное в растворах детергента нужно принимать во внимание и в других исследованиях. В месте тем явление концентрирования красителей в растворах детергента убеждает нас в применимости мицеллярных растворов для исследования миграции возбуждающей энергии при фотосинтеза.

* * *

Авторы считают своим долгом выразить искреннюю благодарность профессору Л. Салаи, руководителю Кафедры биофизики, за ценные советы при подготовке статьи, и Ш. Шипош и И. Декань за выполнение экспериментов по ультрацентрифугированию.

Литература

- [1] Krasnovsky, A. A., G. P. Brin: DAN SzSzSzR **63**, 163 (1948).
- [2] Brin, G. P., A. A. Krasnovsky: Biohimija **22**, 776 (1957).
- [3] Bacon, K., L. P. Vernon: Biochemistry **6**, 2221 (1967).
- [4] Briantais, J. M.: Photochem. Photobiology **5**, 135 (1966).
- [5] Teale, F. W. J.: Nature **181**, 416 (1958).
- [6] Singhal, G. S., E. Rabinowitch, J. Hevesi, V. Srinivasan: Photochem. Photobiology **11**, 531 (1970).
- [7] Mathis, P.: Photochem. Photobiology **9**, 55 (1969).
- [8] Reske, G.: Z. Naturforsch. **24a**, 17 (1969).
- [9] Hevesi, J., E. Lehoczki, E. Bálint: Zs. Pribl. Spektr. **13**, 458 (1970).
- [10] Hevesi, J., E. Bálint, E. Lehoczki: Acta Phys. Polon. Sci. A **38**, 185 (1970).
- [11] Bálint, E., Lehoczki, J. Hevesi: Acta Phys. et Chem. Szeged, **17**, 15 (1971).
- [12] Elias, H. G.: Ultracentrifugen-Methoden (Beckman Instruments G. m. b. H., Munich, 1961).
- [13] Hevesi, J., Zs. Rózsa: Acta Phys. et Chem. Szeged, **17**, 119 (1971).
- [14] Winsor, P. A.: Chem. Rev. **68**, 1 (1968).
- [15] Schönfeldt, N.: Oberflächenaktive analogerungsprodukte des äthylenoxyds (Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 1959).
- [16] Mukarjee, P., R. Y. Mysels: J. Amer. Chem. Soc. **77**, 2937 (1955).

DYE-AGGREGATION IN DETERGENT SOLUTIONS

E. Lehoczki, J. Hevesi

The absorption of light of $5 \cdot 10^{-6} M$ solutions of Rhodamine 6 G with Thionine in the concentration range $2 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-4} M$ was studied. From the absorption spectra, the micellar weight (obtained with ultracentrifugation method) and the dialysis of the dye-detergent solutions it was concluded that 2–3 times higher local concentration of dye exists within the micelles than outside. This aggregation should be considered as a model system in spectroscopical, photochemical and energy migration studies of photosynthetic pigment systems and chloroplast fragments.